

Obtención de plantas transgénicas de papaya var. Maradol Roja con un gen de ACC oxidasa en antisentido

Orelvis Portal*, Edrey A. Rodríguez, Jorge Gallardo, Neyda Bacallao, Ana L. Darías, Rafael Gómez y Elio Jiménez. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: oportal@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN

La papaya constituye un rubro de potencial importancia económica para los países de la región tropical. Sin embargo, las pérdidas postcosecha de la variedad Maradol Roja, la de mayor relevancia para América Central, han sido hasta de un 80%, debido a la falta de infraestructura y de personal calificado en las áreas rurales y en gran medida a la rápida maduración de sus frutos. El proceso de maduración en frutos climatéricos como la papaya, está regulado por los niveles de etileno. Reduciendo la expresión génica de enzimas clave que participan en la biosíntesis de esta fitohormona, se puede lograr disminuir su expresión. Con el objetivo de obtener plantas transgénicas de papaya con retardamiento en la maduración de los frutos, fue aislado el gen *accx1* que codifica para la 1-aminociclopropano-1-carboxil (ACC) oxidasa de la variedad Maradol Roja y fue construido un vector binario con el gen *accx1* en orientación antisentido para ser utilizado en la transformación genética mediante pistola de genes. Se obtuvieron líneas transgénicas *in vitro* de la variedad Maradol Roja, lo cual fue confirmado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

Palabras clave: *Carica papaya*, etileno, maduración, tecnología antisentido

ABSTRACT

Papaya is a crop of economic importance for tropical countries. However, post-harvesting losses of Maradol Roja cultivar, the most important in Central America, have been up to 80%, due to a lack of proper infrastructure and qualified personnel at the rural areas and mainly because of the quick ripening of the fruits. The ripening process in climacteric fruits like papaya is regulated by ethylene levels. By reducing the genetic expression of the key enzymes which participate in the biosynthesis of this phytohormone, a decrease of the expression could be obtained. With the purpose of obtaining transgenic plants with delayed fruit ripening, *accx1* gene encoding for the 1-aminocyclopropano-1-carboxylate (ACC) oxidase of the Maradol Roja variety was isolated and a binary vector for gene gun mediated transformation constructed with this gene in antisense orientation. *In vitro* transgenic lines, verified by PCR, were obtained.

Key words: antisense technology, *Carica papaya*, ethylene, ripening

INTRODUCCIÓN

La papaya, por sus atractivas características organolépticas y su carácter exótico, constituye un rubro de potencial importancia económica para los países de la región tropical. Sin embargo, el acelerado deterioro postcosecha de este tipo de frutos se convierte en un serio problema para la comercialización de los mismos. Se ha estimado que hasta un 70% de la producción agrícola de estas especies frutales tropicales puede perderse debido a problemas asociados con la maduración natural. Entre los diversos cultivares de papaya, la Maradol Roja, es la variedad comercial más explotada en Cuba y Centroamérica. Las pérdidas postcosechas en este cultivo pueden alcanzar hasta un 80% y están asociadas a la consistencia endeble del fruto y al ataque de microorganismos saprófitos, problemas estos que afloran principalmente durante la maduración.

El proceso de maduración, en frutos climatéricos como la papaya, es un evento fisiológico complejo,

en el cual confluyen un gran número de vías metabólicas, reguladas en buena medida por la fitohormona etileno (Reid, 1987). La elucidación de la ruta biosintética del etileno por Yang y Hoffman (1984) abrió una puerta para el aislamiento de las principales enzimas involucradas en el mismo. Reduciendo la expresión génica de enzimas clave que participan en la biosíntesis de esta fitohormona, se puede lograr un retardo en la maduración (Hamilton *et al.*, 1990), efecto que luego puede ser revertido por una simple exposición de los frutos a etileno exógeno (Grierson y Fray, 1993). Una de las estrategias biotecnológicas más empleadas con este fin, se basa en la expresión del ARN antisentido de los genes que codifican para estas enzimas, siendo las más estudiadas la ACC oxidasa y la ACC sintetasa (Ayub *et al.*, 1996).

El presente trabajo tuvo como objetivos principales el aislamiento de la secuencia codificante para la enzima ACC oxidasa de papaya var. Maradol Roja, así como la obtención de plantas transgénicas de

esta variedad, utilizando la tecnología antisentido, con el fin de retardar la maduración de los frutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del gen de ACC oxidasa

Material de partida

Los frutos de papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja) fueron cosechados en la Estación Experimental "Pedro Lantigua" del Instituto de Biotecnología de las Plantas, ubicada en Remedios, Villa Clara, Cuba. Se transportaron inmediatamente al laboratorio para dejarlos madurar a 25°C y 80% de humedad relativa durante siete días. Una vez que los frutos adoptaron una apariencia de madurez, el mesocarpio fue cortado en láminas muy finas, congelado rápidamente en nitrógeno líquido y guardado a -80°C.

Extracción de ARN y reacción de Transcripción Reversa (TR)

Se tomaron 5 g de tejido mesocarpio congelado, los cuales fueron utilizados para la extracción de ARN total, siguiendo un procedimiento diseñado para frutas ricas en polisacáridos (López-Gómez y Gómez-Lim, 1992). El ARN extraído, fue utilizado como molde para la obtención del ADNc codificante para la enzima ACC oxidasa mediante una reacción de TR, seguido por una RCP. Los oligonucleótidos empleados, ACO5' (5' TGC AGC CAT GGA GAA CTT CCC AGT C 3') y ACO3' (5' CCG GTT CTA GAT TTAAGC TTT TGC GG 3'), fueron sintetizados de acuerdo con la secuencia de una ACC oxidasa del cultivar de papaya Tainong 2 (Chi-Tsai *et al.*, 1997), de forma tal, que permitiera amplificar toda la región codificante. En la síntesis de la primera cadena de ADNc se utilizó el kit cDNA synthesis module RPN1256 (Amersham LifeScience, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante y como cebador el oligonucleótido ACO3'. La RCP fue realizada con la enzima *Taq* ADN Polimerasa (Heber Biotech, Cuba) y las condiciones fueron de 28 ciclos a 95°C por 1 minuto, 45°C por 1 min y 72°C por 90 seg, seguido por 7 min a 72°C. El producto de la amplificación por RCP fue visualizado, mediante una tinción con bromuro de etidio, sobre un gel de agarosa al 1%, purificado y clonado en el sitio *EcoR* V del plásmido pGEM®-T Easy Vector (Promega) para su secuenciación.

Estrategia para la construcción del plásmido binario

El sitio *EcoR* I del plásmido pBPF-30 fue utilizado para colocar el gen de ACC oxidasa en antisentido. Posteriormente, el plásmido obtenido fue digerido con la enzima de restricción *BsrB* I y el producto clonado en el sitio *Sma* I del pCAMBIA 2300 (CAMBIA, Australia).

Proceso de transformación

Como material vegetal de partida se utilizaron embriones somáticos obtenidos de embriones cigóticos inmaduros, siguiendo la metodología propuesta por Posada (1995). Para la preparación de las partículas de tungsteno se siguió la metodología descrita por Sanford *et al.* (1992). La transformación se llevó a cabo mediante una pistola de genes de baja presión siguiendo la metodología propuesta por Más *et al.* (2002) modificando la presión del disparo a 140 psi y la distancia de disparo a 9 cm.

Los embriones disparados se colocaron para su selección, pasado los 10 días, en medio de cultivo MS suplementado con 10 mg.l⁻¹ de BASTA^R comercial (AgrEvo, GMBH, Alemania), después de dos subcultivos de 30 días cada uno, se pasaron a medio de cultivo para la conversión de embriones somáticos, en el que permanecieron por igual período de tiempo, a partir del cual se separaron por líneas y luego se colocaron en medio de cultivo de multiplicación de papaya (Posada, 1995).

Análisis molecular de las plantas

Extracción de ADN total

La extracción del ADN fue realizada a partir de 100 mg de tejido foliar provenientes de vitroplantas de papaya mediante el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983) modificado. Cada muestra fue tratada con 10 mg.ml⁻¹ de RNasa (Boehringer Mannheim) durante 1 hora a 37°C, antes de su cuantificación y análisis de integridad.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la realización de la RCP se emplearon 200 ng de ADN total. Se utilizaron los oligonucleótidos bar5' (5'CGA GAC AAG CAC GGT CAA CTT C 3') y bar3' (5'GAA ACC CAC GTC ATG CCA GTT C 3'), diseñados para amplificar un fragmento de 402 pares de bases (pb) del gen que confiere resistencia a fosfotricina. Las condiciones utilizadas para la RCP fueron de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 62°C por 1 min y 72°C por 90 seg, seguido por 7 min a 72°C. El producto de la amplificación por RCP fue visualizado, mediante una tinción con bromuro de etidio, sobre un gel de agarosa 0.8%.

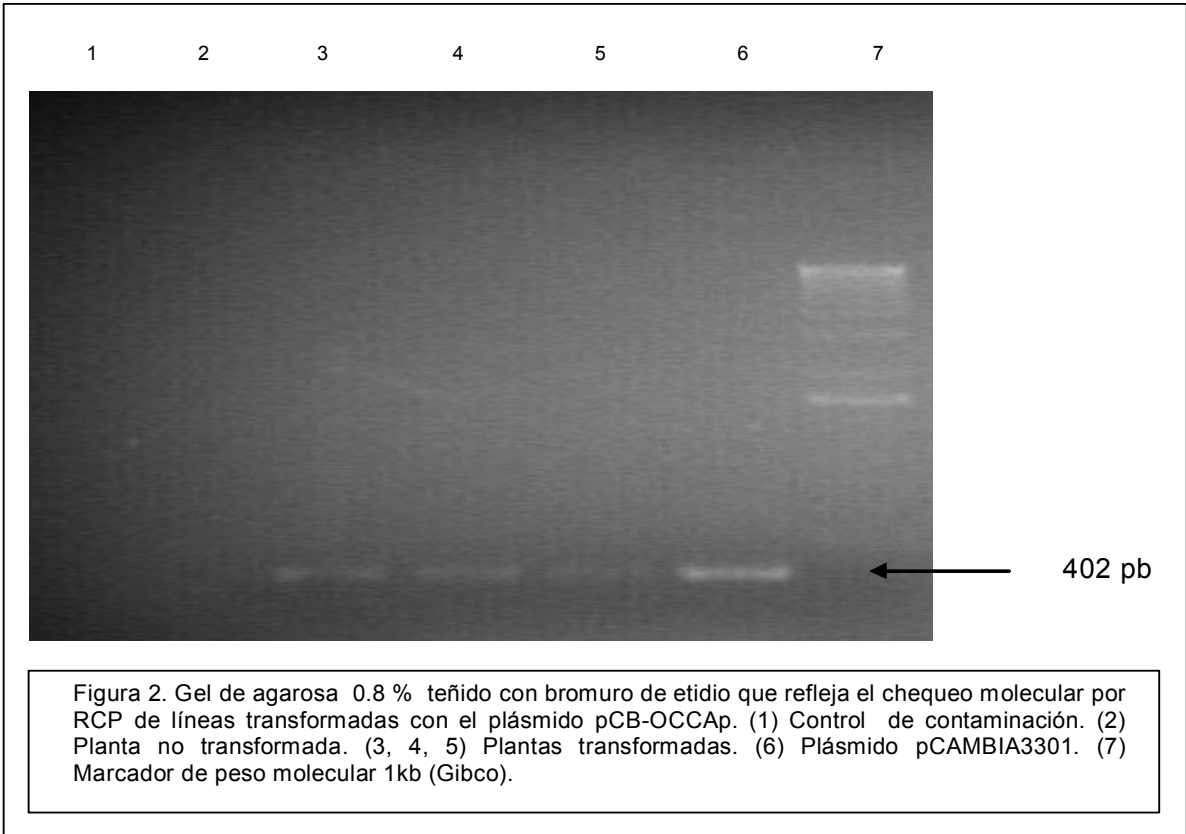
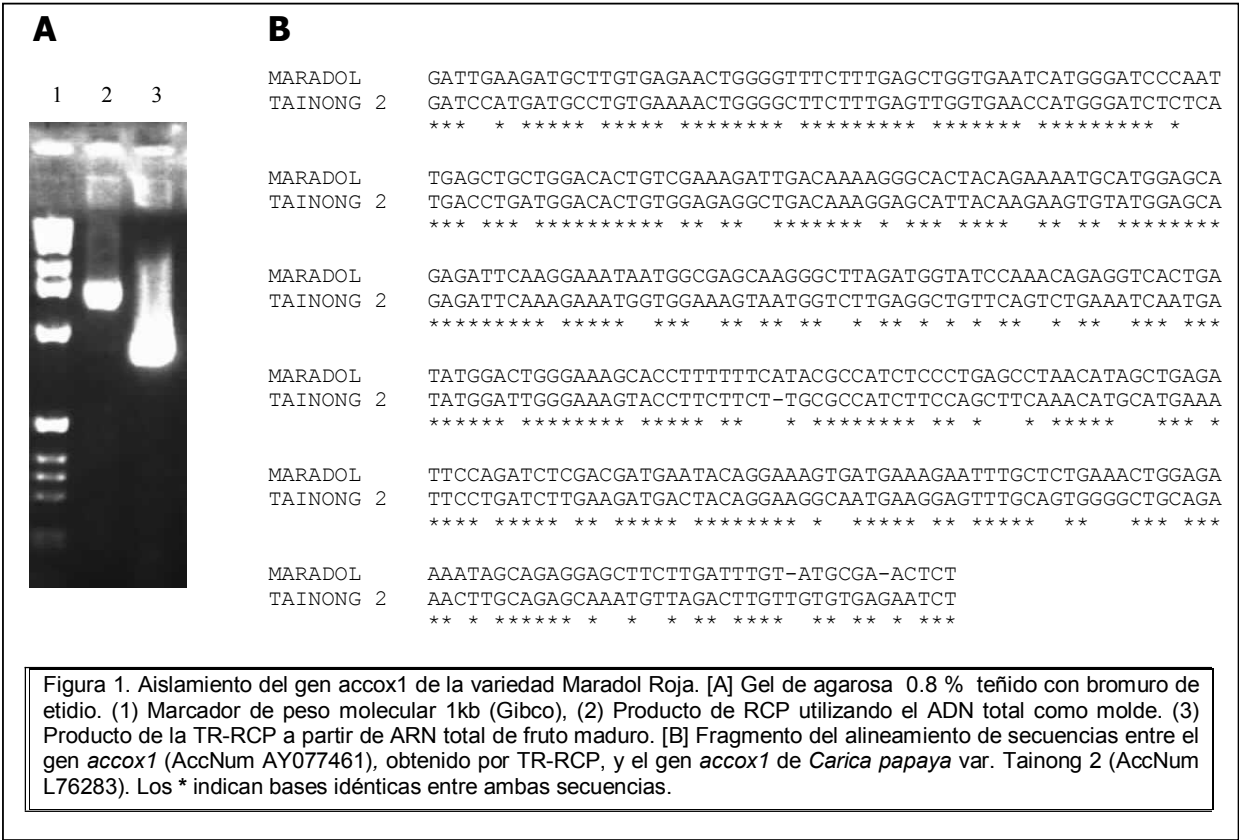
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la secuencia

El producto de la reacción de TR-RCP que fue clonado en el plásmido pGEM®-T Easy Vector y posteriormente secuenciado (número de acceso en Genbank AY077461), corresponde a un fragmento de 963 pb (Fig. 1A), tamaño similar de los genes de

ACC oxidasa referidos hasta el momento en diferentes especies de plantas (Chi-Tsai *et al.*, 1997), el mismo fue denominado *accox1*. La secuencia de *accox1* fue comparada con la secuencia de ACC oxidasa del cultivar Tainong 2 mediante un alineamiento de secuencias, que derivó en un 74% de identidad, lo

que demuestra una alta homología entre los genes de ambas variedades (Fig. 1B). Se utilizaron los oligonucleótidos ACO5' y ACO3' para realizar una RCP sobre ADN total de Maradol Roja y el producto obtenido fue de 1.6 kb, lo que demuestra la presencia de intrones en dicho gen (Fig. 1A).



Construcción del vector binario para la transformación

El producto de la reacción de TR-RCP fue fusionado al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y al terminador del gen *nos* de *A. tumefaciens* situados en el plásmido pBPF-30, de forma tal que la secuencia codificante para la enzima ACC oxidasa quedara en orientación invertida con respecto al promotor y al terminador, resultando en el plásmido pBPF-OCCAp (5.3 kb). La construcción quimérica fue posteriormente insertada en la región T-ADN del plásmido pCambia3300, en la misma orientación que el gen de resistencia a fosfinotricina, resultando en el plásmido pCB-OCCAp (11.2 kb).

Obtención de plantas transgénicas

El tejido transformado fue seleccionado sobre la base de la resistencia al herbicida BASTA^R. Durante el período de regeneración de las plantas, fue observada la formación, en algunos casos, de estructuras anormales las cuales no se tomaron en cuenta para la regeneración de las 20 líneas que fueron obtenidas, de las cuales, solamente tres han resultado ser transgénicas comprobadas por RCP (Fig. 2), lo que ratifica que existen ciertos niveles de escape en el proceso de selección.

REFERENCIAS

Ayub, R, Guis M, Amor MB, Gillot L, Roustan JP, Latché A, Bouzayen M, y Pech JC (1996) Expresión de ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology* 14: 862-866

Chi-Tsai, L, Ming-Tse L y Jei-Fu S (1997) Cloning and characterization of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from papaya fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 526-530

Dellaporta, SL, Wood J, Hincas JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-21

Grierson, D y Fray R (1993) Molecular genetics of tomato fruit ripening. *TIG* 9: 438-443

Hamilton, AJ, Lycett GW, Grierson D (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287

López-Gómez, R y Gómez-Lim MA (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience* 27: 440-442

Más, L, Chong B, Gómez R, Gallardo J, Herrera I y Reyes M (2002) Expresión transitoria de la β -Glucuronidasa en papaya empleando una pistola de genes de baja presión. VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. Resúmenes del Evento. pp. 25

Posada, L (1995) Desarrollo de la embriogénesis somática en la Fruta Bomba (*Carica papaya* L.). Trabajo de Diploma. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV.

Reid, M (1987) Ethylene in plant growth, development and senescence. En: Davies PJ (Ed) *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, pp. 257-279. Martinus Nijhoff, Boston.

Sanford, J, Smith F y Russell J (1992) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymology* 217: 483-509

Yang, SF y Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 155-189